

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/033692 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11527
- (22) Internationales Anmeldedatum:
15. Oktober 2002 (15.10.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 50 984.7 16. Oktober 2001 (16.10.2001) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN [DE/DE]; Arcisstrasse 21, 80333 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HOLM, Per, Sonne [DK/DE]; Meisenstrasse 27, 82256 Fürstenfeldbruck (DE).
- (74) Anwalt: BOHMANN, Armin, K.; Bohmann & Loosen, Sonnenstr. 8, 80331 München (DE).



Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

A2

(54) Title: USE OF THE ADENOVIRAL E2 LATE PROMOTER

WO 03/033692

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG DES ADENOVIRALEN E2-LATE-PROMOTORS

A2

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid construct comprising an adenoviral E2 late promoter or a fragment thereof and a nucleic acid. The nucleic acid is selected from the group of transgenes, genes and nucleic acids which are respectively different from adenoviral nucleic acid controlled by an E2 late promoter. The invention also relates to the uses of said nucleic acid construct.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäurekonstrukt umfassend einen adenoviralen E2-late-Promotor oder ein Fragment davon und eine Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Transgene, Gene und Nukleinsäuren, die jeweils verschieden sind von den durch einen E2-late-Promotor gesteuerten adenoviralen Nukleinsäure, umfasst, und Verwendungen des Nukleinsäurekonstrukttes.

Verwendung des adenoviralen E2-late-Promotors

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines adenoviralen E2-late-Promotors, ein Nukleinsäurekonstrukt umfassend einen adenoviralen E2-late-Promotor, einen dieses Nukleinsäurekonstrukt umfassenden Vektor und die Verwendung des Nukleinsäurekonstruktes.

Bei der Behandlung von Tumoren werden derzeit eine Vielzahl von Therapiekonzepten verfolgt. Neben der Verwendung chirurgischer Techniken stehen dabei die Chemotherapie und die Strahlentherapie im Vordergrund. All diese Techniken sind jedoch für den Patienten mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen verbunden.

Mit der Verwendung von replikationsselektiven onkolytischen Viren wurde eine neue technologische Plattform für die Behandlung von Tumoren geschaffen. Dabei wird eine selektive intratumorale Replikation eines viralen Agens herbeigeführt, die in der Folge zur Virusreplikation, Lyse der infizierten Tumorzelle und Verbreitung des Virus auf benachbarte Tumorzellen führt. Infolge der Beschränkung der Replikationsfähigkeit des Virus auf Tumorzellen bleibt normales Gewebe von der Infektion und damit der Lyse durch den Virus verschont. Beispiele für derartige replikationsselektive onkolytische Viren sind Gen-attenuierte Adenovirus und Herpesviren (Martuza, R. et al. Science 252, 854-858 (1991); Fueyo, J et al. Oncogene 19, 2-12 (2000))

Adenoviren sind in der Technik bekannt. Dabei handelt es sich um dsDNA-Viren (Boulanger, P et al. (1991); Biochem. J. 275, 281-299). Die vollständige Nukleotidsequenz des adenoviralen Genoms ist bekannt und beschrieben in (Chroboczek, J. et al., Virology 1992, 186, 280-285). Ein für die Verwendung von Adenoviren besonders wichtiger Teil des Genoms sind die sogenannten frühen oder early Gene und deren Genprodukte, die als E1, E2, E3 und E4 bezeichnet werden. Dabei umfasst E1 zwei Genprodukten E1A und E1B, die Onkogene darstellen. Die insgesamt drei Genprodukte der Gruppe E2 sind zusammen mit den Genprodukten E3 und E4 an der Replikation beteiligt.

Ein Beispiel für einen onkolytischen Adenovirus ist dl 1520 (Onyx-015), der bereits erfolgreich in den klinischen Phasen I und II eingesetzt wurde (Khuri, F. et al. Nature Medicine 6, 879-885 (2000). Onyx-015 ist ein Adenovirus, bei dem das E1B 55-kDa-Gen deletiert ist. Das E1B-

55kDa-Genprodukt ist beteiligt an der Inhibierung von p53, dem Transport viraler mRNA und dem Abschalten der Proteinsynthese der Wirtszelle. Die Inhibierung von p53 erfolgt dabei durch Ausbilden eines Komplexes aus p53 und dem adenoviral codierten E1B-55 kDa-Protein. Von p53, codiert von TP53, geht ein komplexer regulatorischer Mechanismus aus (Zambetti, G.P. et al., FASEB J, 7, 855-865), der u.a. auch dazu führt, dass eine effiziente Replikation von Viren wie Adenoviren in der Zelle unterdrückt wird. Das Gen TP 53 ist in etwa 50 % aller menschlichen Tumoren deletiert oder mutiert mit der Folge, dass es zu keiner – erwünschten – Apoptose infolge einer Chemotherapie oder einer Bestrahlungstherapie kommt und damit der Erfolg dieser Tumorbehandlungen im Normalfall unterbleibt.

DNA-Tumorviren, wie Adenoviren, treiben die infizierten Zellen in die S-Phase des Zellzyklus, um die virale DNA-Replikation zu erleichtern. Onyx-015 exprimiert das E1B-55 kDa Protein nicht und repliziert selektiv in Tumorzellen gegenüber normalen Zellen. Darüberhinaus besteht eine weitere Selektivität dahingehend, dass solche Tumoren infolge der viralen Lyse der Tumorzellen eine vergleichsweise stärkere Nekrose erfahren, die p53-defizient sind, als jene, die den p53-Wildtyp aufweisen (Khuri et al., aaO). Trotz der grundsätzlichen Wirksamkeit von Onyx-015 bei der viral induzierten Onkolyse im Falle von p53-defizienten Tumoren ist die Erfolgsrate von 15 % der behandelten Tumore sehr gering.

Ries et al. (Ries, S.J. et al. Nature Medicine 6, 1128 – 1132 (2000)) haben eine prinzipielle Möglichkeit aufgezeigt, wie Onyx-015 auch bei Tumoren mit p53-Wildtyp erfolgreich verwendet werden können. Dabei wird das Tumorsuppressor-Protein p14ARF nicht exprimiert. In Folge des Fehlens von p14ARF unterbleibt die normale Reaktion des p53-Systems auf eine virale Infektion und erlaubt damit die Replikation von Onyx-015 auch in diesen Tumoren. Eine Anwendung dieser Erkenntnis setzt jedoch voraus, dass in der Tumorzelle ein geeigneter genetischer Hintergrund existiert oder durch geeignete therapeutische Maßnahmen bereitgestellt wird. Im ersten Falle würde sich die Anzahl der mittels Onyx-015 therapierbaren Tumoren weiter verringern, im zweiten Fall wäre eine aufwendige Änderung des genetischen Hintergrundes der Tumorzellen erforderlich.

Der vorliegenden Erfindung liegt in einem Aspekt die Aufgabe zu Grunde einen Promotor bereitzustellen, der eine tumorspezifischen Expression von Nukleinsäuren erlaubt. In einem anderen Aspekt liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Therapie von YB-1 positiven Erkrankungen, insbesondere von Tumorerkrankungen bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem ersten Aspekt gelöst durch die Verwendung eines adenoviralen E2-late-Promotors oder eines Fragments davon zur Expression von Genen, die verschieden sind von den durch den E2-late-Promotor gesteuerten adenoviralen Genen oder adenoviralen Nukleinsäuren in einem natürlich vorkommenden Adenovirus.

In einem zweiten Aspekt wird die Aufgabe erfundungsgemäß gelöst durch die Verwendung eines adenoviralen E2-late-Promotors oder eines Fragments davon zur Expression eines Transgens oder einer transgenen Nukleinsäure.

In einer Ausführungsform der erfundungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, dass das Promotor-Fragment eine Sequenz gemäß SEQ. ID. No. 1 umfasst.

In einer alternativen Ausführungsform der erfundungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, dass das Promotor-Fragment eine Sequenz gemäß SEQ. ID. No. 2 aufweist.

In einer Ausführungsform der erfundungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, dass der Promotor und/oder das Promotor-Fragment eine Bindungsstelle für YB-1 aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform der erfundungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, dass der Promotor und/oder das Fragment mindestens ein Element aufweist, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die die Y-Box, die TATA-Box und die SPI-Bindungsstelle umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform der erfundungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, dass der Promotor und/oder das Promotor-Fragment YB-1 gebunden aufweist.

In einer Ausführungsform der erfundungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, dass das Transgen und/oder das von dem durch den E2-late-Promotor gesteuerte adenovirale Gen und/oder die von dem durch den E2-late-Promotor gesteuerte Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Genen, die Apoptose-induzierenden Gene, Gene für Pro-Drug-Systeme und Gene für Protease-Inhibitoren umfasst.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, dass das Transgen oder die von der durch den adenoviralen E2-late-Promotor gesteuerten adenoviralen Gene oder Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Antisense-Moleküle, Ribozyme und Aptamere umfasst.

In einem dritten Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Nukleinsäurekonstrukt umfassend einen adenoviralen E2-late-Promotor oder ein Fragment davon und eine Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Transgene, Gene und Nukleinsäuren, die jeweils verschieden sind von den durch einen E2-late-Promotor gesteuerten adenoviralen Nukleinsäure, umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Promotorfragment eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ. ID. No. 1 und SEQ. ID. No. 2 umfasst.

In einem vierten Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch einen Vektor umfassend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt.

In einem fünften Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes zur Herstellung eines Medikaments.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Medikament zur Behandlung von Tumoren verwendet wird.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Tumoren solche sind, die YB-1 im Kern aufweisen.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Tumoren solche sind, die YB-1 im Kern aufweisen, bevorzugter Weise bei Vorliegen eines Stressfaktors YB-1 im Zellkern aufweisen.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Stressfaktor ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hyperthermie, UV-Exposition und Exposition gegenüber Zytostatika umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Medikament zusammen mit Zytostatika und/oder Hyperthermie verwendet wird.

Schließlich ist in einer noch weiteren Ausführungsform vorgesehen, dass der Tumor Tumorzellen mit Vielfachresistenzen aufweist.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zu Grunde, dass YB-1 im Kern an den adenoviralen E2-late-Promotor bindet und sich dieser Promotor auch hervorragend für die Expression von Nukleinsäuren eignet, die verschieden sind von jenen Nukleinsäuren, die in einem adenoviralen System, d.h. in einem natürlicherweise vorkommenden Adenovirus, durch den E2-late-Promotor gesteuert werden. Weiterhin wurde überraschenderweise festgestellt, dass der adenovirale E2-late-Promotor zum einen ein sehr starker Promotor und verglichen mit dem als Gold-Standard verwendeten CMV-Promotor nur unwesentlich schwächer ist bei einer praktisch nicht existierenden Hintergrundexpression für den Fall, dass der Promotor nicht aktiv ist.

Die erfindungsgemäße Verwendung des adenoviralen E2-late-Promotors wird insbesondere durch seine Regulierbarkeit durch YB-1 bestimmt, wobei YB-1 als positiver Effektor wirksam ist, d.h. der Promotor erst bei Anwesenheit von YB-1 im Kern aktiv ist. Insoweit ist der besagte adenovirale E2-late-Promotor hochselektiv regulierbar und somit in Systemen verwendbar, in denen YB-1 im Kern vorhanden ist und praktisch eine jegliche Expression der unter der Kontrolle des adenoviralen E2-late-Promotors stehenden Nukleinsäure verhindert für den Fall, dass YB-1 als Effektor bzw. Regulator im Kern nicht vorhanden ist.

YB-1 ist ein Vertreter der Y-Box-Proteinfamilie, die an das DNA-Sequenzmotiv Y-Box bindet. Das Y-Box-Motiv stellt ein transkriptionell regulatorisches Element dar, das sich in den Promotor- oder Enhancer-Regionen einer Anzahl unterschiedlicher Gene findet, die eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielen (Ladomery, M. et al., 1995; Bioassays 17: 9-11; Didier, D.K. et al., 1988, PNAS, 85, 7322-7326).

Die hierin gemachten Ausführungen gelten auch für Fragmente des besagten adenoviralen E2-late-Promotors, der hierin gelegentlich auch als E2-late-Promotor oder später E2-Promotor bezeichnet wird, und insbesondere für jene Promotor-Fragmente, die hierin offenbart und als SEQ. ID. NO. 1 und SEQ. ID. NO. 2 bezeichnet sind.

Die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ.ID.No. 1 lautet wie folgt:

5'-atttgtacgtgaggactaccacgcccacgagatttt
ctacgaagaccaatccgcggccaaatgcggagc-3'

Die für die Bindung von YB-1 als relevant erachtete Y-Box (CAAT) ist in Fettdruck dargestellt.

Bei der Sequenz gemäß SEQ.ID.NO. 1 handelt es sich um den Bereich der Positionen - 22 bis - 96 des E2-late-Promotors

Die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ.ID.No. 2 lautet wie folgt:

5'- ccacgagattttcacgaagaccaatccgcggccaa-3'

Die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ.ID.No. 2 umfasst den Bereich der Positionen -47 bis - 87 des E2-late-Promotors.

Darüber hinaus ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass ein jegliches Fragment oder Derivat des Promotors verwendet werden kann, solange dieses in der Lage ist, YB-1 zu binden und immer noch eine Promotoraktivität aufweist. Ohne im folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, scheint die Bindung von YB-1 an der Y-Box zu erfolgen oder die Y-Box an der Ausbildung von Sekundärstrukturen beteiligt zu sein, weshalb das Vorhandensein dieser Box als für die Ausgestaltung des adenoviralen E2-late-Promotors und entsprechender erfundungsgemäß verwendeteter Fragmente davon von Bedeutung ist.

Der E2-late-Promotor von Adenovirus ist beispielsweise beschrieben bei Swaminathan, S., and Thimmapaya, B. (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 199, 177-194. Im adenoviralen System kommt dem E2-late-Promotor zusammen mit dem E2-early-Promotor die Funktion zu, die adenovirale E2 Region bzw. die Gene E2A und E2B zu steuern. Dabei erfolgt zunächst die Synthese der E2 mRNA ausgehend vom E2-early-Promotor. Etwa fünf bis sieben Stunden nach Infektion einer Zelle erfolgt ein Umschalten auf den E2-late-Promotor. Der diesem Prozess zu Grunde liegende Mechanismus ist derzeit noch unbekannt.

In der frühen Phase der Infektion mit Adenoviren werden zunächst zwei mRNA-Produkte der E1A-Region hergestellt, die eine Größe von 13S bzw. 12S aufweisen. Untersuchungen haben ergeben, dass das E1A 12S-Protein die Aktivierung der E2-Region über den E2-late-Promotor verhindert bzw. reprimiert. Das Gen, das das E1A 13S-Protein kodiert, aktiviert dagegen die E2-Region bzw. Gene über den E2-early-Promotor. (Guilfoyle RA, Osheroff WP, Rossini, EMBO J 1985, 4, 707-713).

Weiterhin ist bekannt, dass eine Deletion des Bereiches der Nukleotide -51 bis - 33 des E2-late-Promotors die Synthese der E2 Region nahezu völlig reprimiert. (Guilfoyle RA, et al, aaO).

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass jeglicher adenoviraler E2-late-Promotor verwendet werden kann. Derartige unterschiedliche adenovirale E2-late-Promotoren können durch die verschiedenen Formen der Adenoviren, wie sie im Stand der Technik bekannt sind, bedingt sein. Im Stand der Technik sind derzeit ca. 50 Subtypen bekannt, von denen prinzipiell ein jeder im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden könnte, sei es als Vektor oder sei es als Quelle für einen E2-late-Promotor.

Der E2-late-Promotor weist eine Reihe von strukturellen und sequenziellen Merkmalen auf, die für seine Verwendung und insbesondere die Verwendung von Fragmenten des Promotors bedeutsam sein können. Ein derartiges Merkmal ist die Ausbildung einer Schleife (engl. „loop“) im Bereich der Nukleotide -47 bis - 81, wobei mit der Position -1 direkt das erste Nukleotid bezeichnet wird, das unter der Kontrolle des Promotors transkribiert wird. Diese Schleife ist ein integraler Bestandteil der beiden hierin offenbarten Fragmente des E2-late-Promotors, die gleichwohl die hierin für den vollständigen E2-late-Promotor beschriebenen Eigenschaften aufweisen. Ein weiteres Merkmal, welches in den funktional aktiven Fragmenten des E2-late-Promotors bevorzugter Weise enthalten ist, ist die sogenannte Y-Box, die für die Bindung des YB-1-Proteins verantwortlich zu sein scheint. Weitere Elemente, die in bevorzugten Ausführungsformen des E2 late-Promotors und den erfindungsgemäßen Fragmenten enthalten sein können, sind die TATA-Box und die SPI-Bindungsstelle. Dabei ist die TATA-Box für die Initiation der Transkription von Bedeutung und ist gewöhnlicherweise etwa 25 bis 32 bp stromaufwärts von der Transkriptionsinitiationsstelle entfernt. Ein weiteres Merkmal des E2 late-Promotors bzw. eines funktional aktiven Fragmentes davon, das optional vorhanden sein kann, entweder einzeln oder in Ergänzung zu den anderen vorstehend beschriebenen Merkmalen, ist die sogenannte SPI-Bindungsstelle. Die SPI-Bindungsstelle wird durch die sogenannte GC-Box

ausgebildet, an die der Transkriptionsfaktor SPI bindet. Pro Promotor kann mehr als eine GC-Box vorhanden sein.

Das hierin offenbare Nukleinsäurekonstrukt bzw. der E2-late-Promotor oder ein funktional aktives Fragment davon, kann entweder in einer Form vorliegen, bei der YB-1 gebunden ist, oder in einer YB-1 -freien Form. Bei Bindung von YB-1 ist der Promotor funktional aktiv und es kann in einem geeigneten Transkriptionssystem eine Transkription erfolgen; bei Abwesenheit von YB-1 ist der Promotor nicht aktiv, so dass in einem Transkriptionssystem keine Transkription beobachtet werden kann. Geeignete Transkriptionssysteme sind beispielsweise beschrieben in Lewin, B., Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik, VCH Verlagsgesellschaft, 6490 Weinheim, Germany.

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es möglich, dass praktisch eine jegliche Nukleinsäure unter die Kontrolle des adenoviralen E2-late-Promotors gestellt wird, der dann die Expression der Nukleinsäure steuert. Der E2-late-Promotor steht dabei unter der stringenten Kontrolle durch YB-1. Als mögliche Nukleinsäuren können dabei sowohl Gene wie auch allgemein kodierende Sequenzen, oder Fragmente davon, aber auch nicht-kodierende Nukleinsäuren verwendet werden. Bei der Expression von im weitesten Sinne kodierende Nukleinsäure und deren Steuerung durch den E2-late-Promotor ist dabei vorgesehen, dass die für Promotoren üblichen Erfordernisse gegeben sind, d. h. ein geeignetes Initiationscodon existiert und der Promotor in einem solchen Abstand von diesem Initiationscodon platziert wird, dass eine Translation möglich ist. Gleiches gilt grundsätzlich auch hinsichtlich der Erfordernisse, wie sie für die Transkription bestehen.

Grundsätzlich ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine jegliche codierende Nukleinsäure verwendet werden kann. Mit Blick auf die spezifische Regulierbarkeit des Promotors durch YB-1 und damit der Anwendung des Vektors in einem biologischen System, das sich durch Abwesenheit oder Anwesenheit dieses Effektor auszeichnet, ergeben sich bevorzugte Kombinationen von codierenden Sequenzen mit dem E2-late-Promotor. Nachdem YB-1 insbesondere mit verschiedenen Tumorgeschehen in Verbindung gebracht wird, können bevorzugte Nukleinsäuren solche sein, die bei der Behandlung von Tumoren auf der molekularen Ebene bedeutsam sein können. Dazu gehören beispielsweise Apoptose-induzierende Gene. Mit dem Einschleusen von derartigen Gene in Tumorzellen, die YB-1 im Kern aufweisen (beispielsweise 30 % der Ovarialkarzinome [Kamura et al., 1999; Cancer, 85, 2450-2454; Shibao

K, Takano H, Nakayama Y, Okazaki K, Nagata N, Izumi H, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K, Itoh H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 1999 Dec 10;83(6):732-7], sei es natürlicherweise oder induziert, können ausschließlich die Tumorzellen die an den Promotor gekoppelten Gene exprimieren mit der Folge, dass lediglich in diesen Zellen die durch die Apoptose-induzierenden Gene verursachte Apoptose abläuft. Ähnlich verhält es sich mit anderen, solchermaßen eingeschleusten Genen. Bevorzugterweise werden solche Gene eingeschleust, die zu einer Änderung des Verhaltens der Zellen, wie beispielsweise des Tumorcharakters der Zellen und/oder zur selektiven Abtötung der Tumorzellen führen. Neben den Apoptose-Genen können auch solche Gene eingeschleust werden, die sehr unmittelbar in das zelluläre Geschehen eingreifen, so z.B. Protease-Inhibitoren. Solche Protease-Inhibitoren sollen im allgemeinen das invasive Verhalten bzw die Metastasierung der Tumoren inhibieren. Darunter fallen Matrix-Metallo Proteasen, (MMP), Plasminogen Aktivator System (uPA), Cathepsine. Weiterhin kann der E2-late-Promotor erfindungsgemäß dazu verwendet werden, dass er die Expression viraler Proteine steuert, wobei die viralen Proteine solche sind, die normalerweise, d. h. in den natürlich vorkommenden Adenoviren, nicht unter der Kontrolle des E2-late-Promotors stehen. Insbesondere sind dies die viralen Proteine E3ADP, E4orf6 und E1B55k. E4orf6 ist ein multifunktionelles Protein, welches für die maximale virale DNA-Replikation und Partikelbildung benötigt wird. Ferner spielt es eine wichtige Rolle beim Splicing und Transport der viralen RNA. Zudem interagiert es mit dem viralen Protein E1B55k, um die Inaktivierung von p53 zu beschleunigen. E1B55k ist ebenfalls ein multifunktionelles Protein, welches in Wechselwirkung mit dem E4orf6-Protein den Export der viralen RNA fördert, wohingegen die zelleigenen RNAs im Zellkern zurückgehalten werden. Eine weitere wichtige Funktion von E1B55k besteht darin, alleine und/oder zusammen mit E4orf6 das zelluläre Protein p53 zu inaktivieren. E3ADP, auch als adenoviral death protein, d. h. adenovirales Todes-Protein, bezeichnet, ist ein integrales Membran-Glycoprotein, welches für eine effiziente Zellyse und Freisetzung der neu synthetisierten Viren benötigt wird. Die vorstehend genannten viralen Proteine sind ansonsten den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und in der Literatur beschrieben.

- Die selektive Abtötung der Zellen kann entweder direkt unter dem Einfluss der eingeschleusten Gene oder indirekt infolge der durch die eingeschleusten Gene bedingten Änderungen in den Zellen erfolgen. Eine derartige Änderung kann beispielsweise auch dazu führen, dass weitere von außen zugeführte Verbindungen erst auf die Zellen wirken und somit zu beispielsweise einer Abtötung der Tumorzellen führen. Ein Beispiel für diesen Ansatz stellen Gene dar, die dem Pro-

Drug-System zuzurechnen sind. Das Pro-Drug-System ist ein System von insbesondere Enzymen, die dazu führen, dass metabolisch nicht aktive chemische Verbindungen, die beispielsweise als Arzneimittel einem Organismus zugeführt werden, erst im Körper in die pharmazeutisch wirksame Form überführt werden. Ein Beispiel für ein Pro-Drug stellt beispielsweise das Thymidin-Kinase-System (TK-System) dar. Es beruht auf der Expression des Herplex Simplex Thymidin Kinase Gens (HSVtk) nach Zugabe der Prodrug Ganciclovir. Diese ist für den Menschen in dieser Form nicht toxisch. Die Thymidin-Kinase phosphoryliert das Substrat Ganciclovir. Es entsteht ein Purinanalog, welches toxisch ist. Ein weiteres Beispiel stellt das System Cytosin Desaminase Gen (CD) dar.

Die Kopplung des adenoviralen E2-late-Promotors an eine nicht-kodierende Nukleinsäure ist beispielsweise auch an rRNA oder tRNA möglich. Insoweit ist eine verstärkte Expression dieser für das Funktionieren eines zellulären Systems wesentlichen RNA-Populationen möglich, die wiederum mit einer Vielzahl von zellulären Wirkungen und Funktionen verbunden sein können.

Eine weitere Form der nicht-kodierenden Nukleinsäuren, die unter die Kontrolle des adenoviralen E2-late-Promotors gestellt werden können, sind Aptamere, Ribozyme, anti-sense-Moleküle und siRNA. Aptamere sind dabei Nukleinsäuren, bevorzugterweise Ribonukleinsäuren, die spezifisch an ein Zielmolekül, gegen das sie selektiert wurden, binden. Die Herstellung derartiger Aptamere ist beispielsweise im europäischen Patent EP 0 533 838 beschrieben. Eine weitere Gruppe von Nukleinsäuren, die unter die Kontrolle des adenoviralen E2-late-Promotors gestellt werden können, sind anti-sense-Moleküle, deren Wirkprinzip darauf beruht, dass diese Moleküle mit mRNA einen Komplex bilden und somit die Translation der mRNA verhindern. In einer Ausführungsform sind anti-sense Moleküle auch in einer solchen Form bekannt, dass das zelluläre RNase H-System aktiviert und in Folge der enzymatischen Aktivität des RNase H-System die mit dem anti-sense Molekül komplexierte oder hybridisierte mRNA abgebaut wird.

Schließlich können die nicht-kodierenden Nukleinsäure auch Ribozyme sein, d. h. Nukleinsäuren, die katalytisch aktiv sind und entweder intramolekulare oder intermolekulare Nukleinsäuren, insbesondere Ribonukleinsäure, spalten, d.h. hydrolysieren können. In Folge der Sequenzspezifität von Ribozymen ist es möglich, spezifische Nukleinsäure-Populationen in einem biologischen System wie einer Zelle selektiv zu hydrolysieren und somit biologische Prozesse zu beeinflussen.

Das hierin offenbarte Nukleinsäurekonstrukt kann in dem Umfang ausgestaltet werden, wie dies vorstehend für die verschiedenen Verwendungen des E2-late-Promotors und Fragmenten davon beschrieben ist.

Das Nukleinsäurekonstrukt kann in verschiedenen Formen vorliegen. So ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das Nukleinsäurekonstrukt Teil eines Vektors ist. Derartige Vektoren sind den Fachleuten bekannt und umfassen beispielsweise Plasmide und Viren. Bevorzugter Weise sind die Vektoren solche für eukaryontische Zellen, insbesondere für Säugetierzellen. Virale Vektoren umfassen, unter anderem, adenovirale Vektoren, retrovirale Vektoren, adeno-assoziierte Vektoren (AAV) und Herpes-Simplex Vektoren. Alle Vektoren sind erwähnt bzw. beschrieben in Dougherty, GJ., Chaplin, D., Dougherty, ST., Chiu, RK, McBridge, Wh. *In vivo gene therapy of cancer, Tumor Targeting*, 2, 106-114 (1996); *Advances in Pharmacology: Gene Therapy*, Editor J. Thomas August, Volume 40, Academic Press.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt kann allgemein zur Herstellung von Medikamenten verwendet werden. Dabei bestehen hinsichtlich der Art der Indikationen für derartige Medikamente keine Einschränkungen, solange die Medikamente dadurch gekennzeichnet sind, dass sie entstehen oder zur Wirkung gelangen durch die Verwendung des adenoviralen E2-late-Promotors oder eines funktional aktiven Fragmentes davon, wie hierin offenbart. Mit anderen Worten, Medikamente im Sinne der vorliegenden Erfindung sind auch solche, die aus bekannten Genen oder allgemein Nukleinsäuren bestehen, sofern diese unter der Kontrolle des adenoviralen late E2-Promotors oder eine funktional aktiven Fragmentes davon stehen.

Eine bevorzugte Indikation für die Anwendung der erfindungsgemäßen Medikamente stellen Tumorerkrankungen dar. Dies liegt in der hierin offenbarten Bindung von YB-1 an den adenoviralen E2-late-Promotor und der damit begründeten spezifischen Regulierbarkeit des Promotors begründet, so dass jene Nukleinsäure, die unter der Kontrolle des adenoviralen E2-late-Promotors oder eines funktional aktiven Fragmentes davon steht, spezifisch in Tumorzellen exprimiert wird, die YB-1 im Kern aufweisen. Normale, insbesondere humane, Zellen, weisen YB-1 nur im Zytoplasma auf, so dass diese keine Expression der unter der Kontrolle des adenoviralen E2-late-Promotors oder eines funktional aktiven Fragmentes davon stehenden Nukleinsäure zeigen.

Infolge der Kopplung der Aktivierung der unter der Kontrolle des adenoviralen E2-late-Promotors oder eines funktional aktiven Fragmentes davon stehenden Nukleinsäure mit im Zellkern vorhandene YB-1 können mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt auch solche Erkrankungen und insbesondere Tumorerkrankungen behandelt werden, bei denen YB-1 nur dann im Zellkern vorliegt, wenn bestimmte Bedingungen vorliegen, die dazu führen, dass YB-1 im Kern ausschließlich, überwiegend oder in einem gegenüber dem Nicht-Vorliegen der besagten bestimmten Bedingungen verstärkten Umfang vorliegt. Im Bereich der Tumorerkrankungen kann die Lokalisation von YB-1 im Kern dadurch bewirkt werden, dass die Zellen Stressfaktoren ausgesetzt werden. Derartige Stressfaktoren sind beispielsweise Hyperthermie, UV-Strahlung oder die Behandlung der Zellen bzw. des diese enthaltenden Organismus durch Zytostatika. Derartige Zytostatika umfassen, unter anderem, cis-Platin.

Weitere Zellen, die der Behandlung durch das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt grundsätzlich zugänglich sind, sind die sogenannten vielfachresistenten Tumorzellen. Die Vielfachresistenz (engl. multi drug resistance) wird durch die Synthese des P-Glycoproteins bedingt. Der Zusammenhang zwischen YB-1 und der MDR-1-Genexpression (MDR - multiple drug resistance) wurde beschrieben durch Bargou et al. (Bargou, R.C. et al., Nature Med. 3, 1997, 4 : 447 - 450). Infolge dieses Zusammenhangs sind auch solche Tumorzellen und diese enthaltenden Tumoren mittels des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes adressierbar und therapiertbar, die P-Glycoprotein positiv sind.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der Figuren, Beispiele und des Sequenzprotokolls veranschaulicht, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteilen der Erfindung ergeben. Dabei zeigt

Fig. 1 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von U2OS-Zellen, die mit einem Vektor kodierend für Grün-fluoreszierendes Protein unter Kontrolle des CMV-Promotors (Fig. 1A, 1B), unter Kontrolle des E2-late-Promotors (Fig. 1C, 1D) und unter Kontrolle eines in der YB-1-Box mutierten E2-late-Promotors (Fig. 1E, 1F) transfiziert wurden, nach Infektion mit einem E1/E3 deletierten Adenovirus (Fig. 1A, 1C, 1E) und einen YB-1 exprimierenden E1/E3-deletierten Adenovirus (Fig. 1B, 1D, 1F); und

Fig. 2 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von YB-1-kernnegativen U2OS-Zellen (Fig. 2A) und YB-1-kernpositiven Zellen (Fig. 2B) nach Transfektion mit einem Plasmid, das für Grün-fluoreszierendes Protein unter der Kontrolle des Adenoviralen E2-late-Promotors kodiert.

Beispiele

Beispiel 1: Der E2-late-Promotor ist YB-1-spezifisch

Der E2-late-Promotor wurden in den Vektor pGL3-Enhancer (Firma Promega) in die XhoI- und HindIII-Schnittstelle kloniert. Als Reportergen besitzt dieser Vektor das Luciferase-Gen oder alternativ das GFP-Gen. Sobald GFP exprimiert wird, leuchten die Zellen grün auf. Zunächst wurden 200.000 U2OS Zellen pro Napf in 6-Napf-Platten ausgelegt. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion der die verschiedenen Fragmente des E2-late-Promotors enthaltenden verschiedenen Vektoren mittels Superfect nach Herstellerangaben (Qiagen). Die Plasmide wurden aus dem pGL3-Enhancer-Vektor, Firma Promega, hergestellt, wobei das Luziferasegen durch das Reportergen GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) ausgetauscht.

Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit 50 pfu/Zelle mit einem E1/E3 deletierten Adenovirus (AdlacZ, linke Spalte von Fig. 1) und AdYB-1 (rechte Spalte von Fig. 1) infiziert. AdYB-1 ist ein E1/E3 deletiertes Adenovirus, welches als Transgen den Transkriptionsfaktor YB-1 exprimiert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass durch die Expression von YB-1 nur der intakte E2-late-Promotor eingeschaltet wird, wie in Fig. 1D dargestellt. Die in Fig. 1A und 1B dargestellten Zellen wurden als Positivkontrolle mit Plasmidkonstrukten transfiziert, bei denen das Grün-fluoreszierende Protein unter die Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors (CMV) gestellt wurde. Bei den in Fig. 1C und Fig. 1D dargestellten Konstrukten bzw. Versuchen wurde der E2-late-Promotor erfindungsgemäß verwendet, d. h. die Expression des Grün-fluoreszierenden Proteins unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt. Bei den in Fig. 1E und Fig. 1F dargestellten Zellen wurde anstelle des E2-late-Promotors von Adenovirus ein mutierter E2-late-Promotor von Adenovirus verwendet. Die Mutation lag dabei in der YB-1-Box, wobei die Sequenz GCCTG statt ATTGG verwendet wurde.

Beispiel 2: E2-late-Promotor ist spezifisch für YB-1-kernpositive Zellen

Für die Untersuchung der Spezifität des E2-late-Promotors in resistenten YB-1-kernpositiven Zellen wurde das folgende Experiment durchgeführt.

Es wurden 200.000 Zellen pro Napf in einer 6-Napf-Platte ausgelegt. Ein synthetisierter E2-late-Promotor im pGL3-Enhancer-Vektor (erhältlich von Promega) mit dem Reportergen GFP wurde mittels Superfect der Firma Qiagen nach Herstellerangaben 24 Stunden später in die Zellen transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop.

Fig. 2A zeigt das Ergebnis der Osteosarkomzellen U2OS, die kein YB-1 im Kern aufweisen. In Fig. 2B ist das Ergebnis unter Verwendung von gegen eine Vielzahl von Wirkstoffen resistenten (engl. multi drug resistant) Magenkarzinomzellen 257RDB dargestellt. Bei diesen Zellen ist YB-1 im Zellkern lokalisiert. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass nur in YB-1 kernpositiven 257RDB-Zellen das Reportergen GFP über den E2-late Promotor eingeschaltet wird.

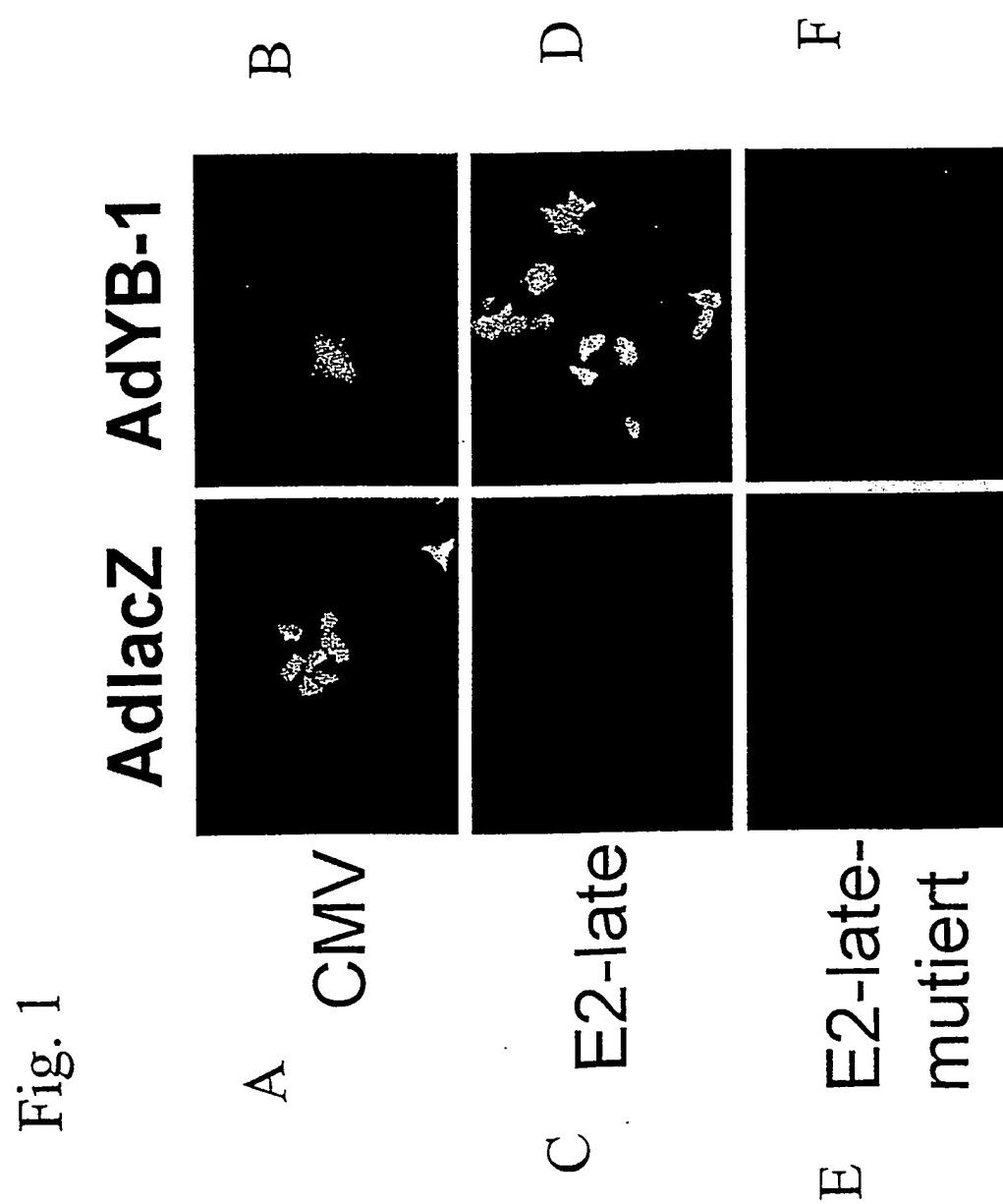
Die in der vorangehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination zur Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Verwendung eines adenoviralen E2-late-Promotors oder eines Fragments davon zur Expression von Genen, die verschieden sind von den durch den E2-late-Promotor gesteuerten adenoviralen Genen oder Nukleinsäuren.
2. Verwendung eines adenoviralen E2-late-Promotors oder eines Fragments davon zur Expression eines Transgens oder einer transgenen Nukleinsäure.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Promotor-Fragment eine Sequenz gemäß SEQ. ID. No. 1 umfasst.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Promotor-Fragment eine Sequenz gemäß SEQ. ID. No. 2 aufweist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor und/oder das Promotor-Fragment eine Bindungsstelle für YB-1 aufweist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor und/oder das Fragment mindestens ein Element aufweist, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die die Y-Box, die TATA-Box und die SPI-Bindungsstelle umfasst.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor und/oder das Promotor-Fragment YB-1 gebunden aufweist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Transgen und/oder das von dem durch den E2-late-Promotor gesteuerte adenovirale Gen und/oder Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Genen, die Apoptose-induzierende Gene, Gene für Pro-Drug-Systeme und Gene für Protease-Inhibitoren umfasst.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Transgen oder die von der durch den adenoviralen E2-late-Promotor gesteuerten adenoviralen Gene oder Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Antisense-Moleküle, Ribozyme und Aptamere umfasst.

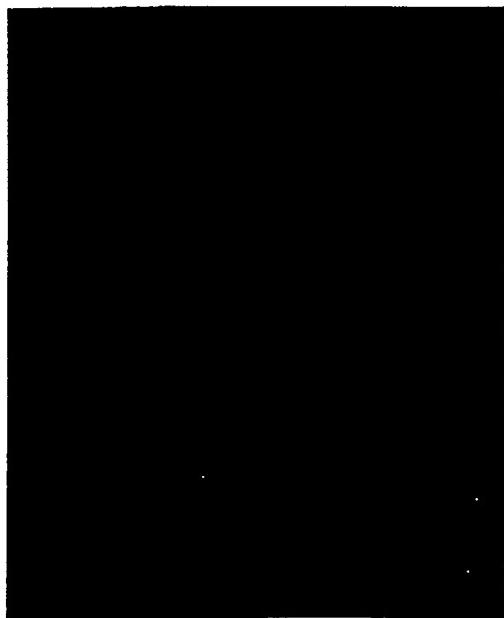
10. Nukleinsäurekonstrukt umfassend einen adenoviralen E2-late-Promotor oder ein Fragment davon und eine Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Transgene, Gene und Nukleinsäuren, die jeweils verschieden sind von den durch einen E2-late-Promotor gesteuerten adenoviralen Nukleinsäure, umfasst.
11. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Promotorfragment eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO1 und SEQ ID NO2 umfasst.
12. Vektor umfassend ein Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 10 oder 11.
13. Verwendung eines Nukleinsäurekonstruktes nach Anspruch 10 oder 11 zur Herstellung eines Medikaments.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur Behandlung von Tumoren verwendet wird.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumoren solche sind, die YB-1 im Kern aufweisen.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumoren solche sind, die YB-1 im Kern aufweisen, bevorzugter Weise YB-1 bei Vorliegen eines Stressfaktors im Zellkern aufweisen.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Stressfaktor ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hyperthermie, UV-Exposition und Exposition gegenüber Zytostatika umfasst.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zusammen mit Zytostatika und/oder Hyperthermie verwendet wird.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor Tumorzellen mit Vielfachresistenzen aufweist.

1/2



2/2

A



B

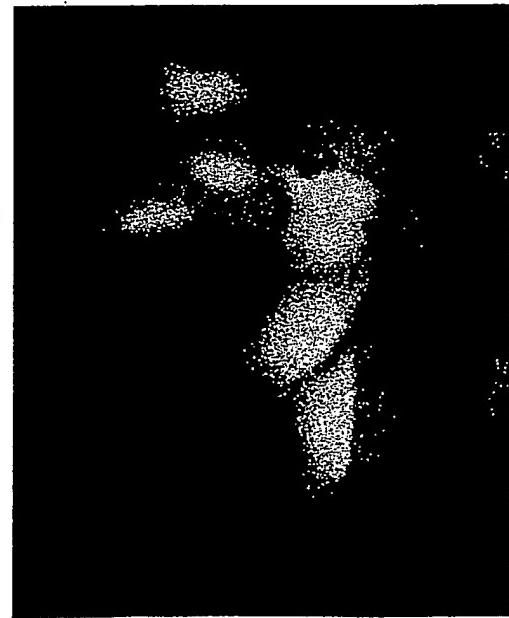


Fig. 2

U2OS

257RDB

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dr. Holm, Per Sonne

<120> Verwendung des adenoviralen E2-late-Promotors

<130> H10005 PCT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 74

<212> DNA

<213> Adenovirus

<220>

<223> Fragment des E2-late-Promotors

<400> 1

atttgtacct gaggactacc acgcccacga gattaggttc tacgaagacc aatcccgccc
gcctaaatgcg gagc

74

<210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213> Adenovirus

<220>

<223> Fragment des E2-late-Promotors

<400> 2

ccacgagatt aggttctacg aagaccaatc ccgcccccca a

41